

Received: 2010.06.16
Accepted: 2010.11.19
Published: 2010.12.07

Metylacja i jej rola regulacyjna wobec rodzicielskiego piętna genomowego

Methylation of DNA is an epigenetic modification critical for gametic imprinting

Marta Olszewska, Maciej Kurpisz

Institut Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

Streszczenie

Metylacja DNA jest modyfikacją epigenetyczną odgrywającą główną rolę w procesie piętnowania gamet. Piętnowanie gamet określa zjawisko zróżnicowanej ekspresji dla puli genów rodzicielskich w nowo powstałym organizmie. Celem piętnowania jest to, aby z pary alleli odziedziczonych od rodziców, ekspresji ulegał tylko jeden określony allel matczynej lub ojcowskiej. Zaburzenia w piętnowaniu rodzicielskim mogą powodować występowanie chorób genetycznych potomstwa (m.in. zespoły Angelmana (AS)/Pradera-Williego (PWS), Beckwitha-Wiedemanna (BWS), Silver-Russella (SRS)) oraz wpływać na pojawienie się zmian nowotworowych. Ponadto zastosowanie niedojrzałych gamet (również pod względem piętna) w technikach wspomaganego rozrodu niesie ryzyko wystąpienia chorób genetycznych w rozwoju osobniczym. Rodzicielskie piętno genomowe ustalone podczas gametogenezy jest dziedziczone przez potomstwo i nie ulega zmianom podczas rozwoju osobniczego.

Słowa kluczowe:

piętnowanie gamet/genomu • metylacja DNA • modyfikacje epigenetyczne

Summary

Differences in epigenetic patterns in male and female organisms highlight the key role of epigenetic mechanisms in development, initiated in gametogenesis. A consequence of imprinting is the expression of only one allele – maternal or paternal. Disturbances in imprinting cause genetic disorders (e.g., Angelman syndrome, Prader-Willi syndrome, Beckwith-Wiedemann syndrome, Silver-Russell syndrome) or influence cancer development. Also immature gametes used in artificial reproductive technologies may increase the risk of genetic disorders in offspring. Imprinting is heritable and does not change during the lifetime of an organism.

Key words:

gametic/genomic imprinting • DNA methylation • epigenetic modifications

Full-text PDF:

<http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=924953>

Word count:

2875

Tables:

–

Figures:

3

References:

77

Adres autora: prof. dr hab. Maciej Kurpisz, Instytut Genetyki Człowieka, Polskiej Akademii Nauk, Zakład Biologii Rozrodu i Komórki Macierzystych, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań; e-mail: kurpimac@man.poznan.pl, martaze@man.poznan.pl

Wykaz skrótów: **ART** – techniki wspomaganego rozrodu (human-assisted reproduction technologies); **BORIS** – białko regulacyjne miejsc z piętnem (brother of regulation of imprinted sites); **CTCF** – czynnik wiążący CCCTF (CCCTF-binding factor); **DMD/DMR** – domena/region o zróżnicowanej metylacji (differentially methylated domain/differentially methylated region); **DNMT** – metylotransferaza DNA (DNA-methyltransferase); **IC/ICR** – centrum piętnowania/region kontroli piętnowania (imprinting center/imprinting control region); **ICSI** – docytoplazmatyczna mikroiniekcja plemnika (intracytoplasmic sperm injection); **UPD** – disomia jednorodzielska (uniparental disomy).

Zmiany epigenetyczne są odpowiedzialne za występowanie i dziedziczenie wzoru ekspresji genów, przy czym nie wpływają na sekwencję nukleotydową DNA. Głównym mechanizmem epigenetycznym regulującym ekspresję genów, oprócz czynników epigenetycznych, takich jak acetylacja czy fosforylacja jest symetryczna metylacja cytozyny w pozycji 5' dinukleotydu CpG. Metylacja odpowiedzialna jest za piętnowanie gamet, inaktywację chromosomu X, a także zmiany w konformacji białek oraz wyciszanie ekspresji genów z udziałem niskocząsteczkowego RNA [46]. Ponadto metylacja reszt lizynowych histonów wpływa na zmiany konfiguracji chromatyny, tzn. w zależności od tego, która lizyna jest zmetylowana, różny jest poziom aktywności transkrypcyjnej danego genu, np. metylacja H3K4 w miejscu startu transkrypcji jest skorelowana z aktywną ekspresją genu, w przeciwieństwie do metylacji H3K9 w promotorze, wywołującej brak ekspresji genu [9]. Obserwowane od lat różnice we wzorach metylacji genomu w zależności od płci, wskazują na istotną rolę mechanizmów epigenetycznych w prawidłowym rozwoju organizmów począwszy od gametogenezy.

Do prawidłowego rozwoju ludzkiego zarodka konieczna jest jednoczesna obecność genomów męskiego i żeńskiego, które różnią się w funkcjonowaniu, co zostało odkryte podczas uzyskiwania zarodków mysich w wyniku mikromanipulacyjnego podawania przedjądrza do oocyty [16,33,41]. Zaobserwowano, że embriony ginogenetyczne (dwa przedjądrza żeńskie w oocycie) oraz androgenetyczne (męskie) nie rozwijały się prawidłowo i obumierały, mimo prawidłowej liczby chromosomów. Wykazano, że genom ojcowski jest odpowiedzialny za wczesny rozwój łożyska, natomiast matczyński za rozwój zarodka, co jednoznacznie oznacza nierównocześnieść genetyczną genomów matki i ojca [5,17]. Różnice funkcjonalne genomów rodzicielskich wynikają z tzw. piętnowania gamet (imprinting), do którego dochodzi podczas gametogenezy.

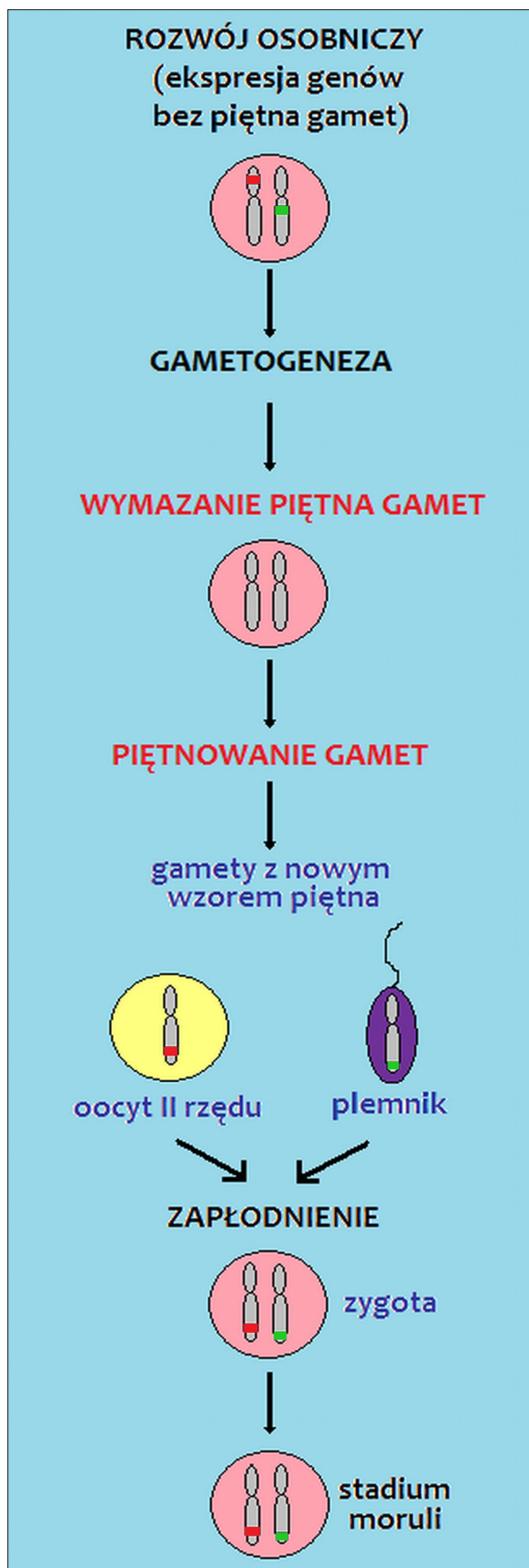
PIĘTNOWANIE GAMET A METYLACJA DNA

Piętnowanie (wyłączenie) określa zjawisko zróżnicowanej ekspresji dla pewnej puli genów rodzicielskich w nowo powstałym organizmie i dotyczy 0,1–1% wszystkich genów [59]. Jest rzeczą funkcjonalnie istotną, aby z pary alleli odziedziczonych od rodziców, ekspresji ulegał tylko jeden określony allel (matczyński lub ojcowski). Dotychczas u ssaków zidentyfikowano 27 regionów chromosomów zawierających prawie 80 jednostek transkrypcyjnych (tj. grup transkryptów o wspólnej lokalizacji chromosomowej)

ulegających piętnowaniu, w tym około 40 u ludzi i ponad 2000 u myszy [53,60]. Mechanizm piętnowania polega na metylacji DNA, w wyniku której geny metylowane stają się nieaktywne. Nałożenie piętna poprzez metylację DNA zachodzi podczas gametogenezy (ryc. 1) [1,8].

Piętnowanie w oocytach odbywa się podczas fazy wzrostu oocytów I rzędu. W stadium pęcherzyków pierwotnych lub pierwszorzędowych napiętnowaniu ulegają geny: *Snrpn*, *Znf127*, *Ndn*; natomiast przy pęcherzykach drugorzędowych piętnowanie dotyczy genów: *Peg3*, *Igf2r* i *p57^{KIP2}* [26,47,54]. W męskich komórkach rozrodczych do nałożenia piętna dochodzi w spermatocytach I rzędu w czasie leptotenu i zygotenu [1,8,38]. W męskiej linii komórek rozrodczych dotychczas szczegółowo zajęto się 3 genami: *IGF2/H19*, *Rasgrf1*, *Gtl2* [44,70]. Wzór piętna odziedziczony od rodziców nie ulega zmianom w trakcie rozwoju organizmu, mimo że procesom różnicowania komórek i tkanek towarzyszą liczne modyfikacje epigenetyczne całego genomu. Cykl przeprogramowania komórek zostaje zakończony na wczesnych etapach rozwoju zarodka. Wtedy to dochodzi do wytworzenia pierwotnych komórek płciowych, które ulegają przemieszczeniu do związków gonad. W tym czasie rozpoczyna się wymazywanie rodzicielskiego piętna genomowego. Proces ten zostaje zakończony w profazie I podziału mejotycznego w przypadku oocytów, natomiast w przypadku spermatogonii odbywa się to na etapie mitozy [1,49].

Jedną z modyfikacji epigenetycznych całego genomu jest metylacja towarzysząca piętnowaniu gamet, ale całkowicie niezależna od procesu gametogenezy. Podczas rozwoju gamet, kiedy dochodzi do wymazania i ponownego nałożenia piętna gametom, występuje spadek a następnie wzrost liczby metylowanych grup DNA. Po zapłodnieniu dochodzi do gwałtownej demetylacji obu genomów, zanim zarodek osiągnie stadium moruli. Genom ojcowski ulega gwałtownej demetylacji jeszcze przed utworzeniem przedjądrza męskiego, natomiast demetylacja genomu matczyńskiego rozpoczyna się i stopniowo postępuje po powstaniu obu przedjądrzy. Jedynie geny, których dotyczy zjawisko piętnowania nie ulegają zmianom w metylacji i tym samym zarodek dziedziczy wzór piętnowania od rodziców. Po osiągnięciu przez zarodek stadium moruli oba genomy ulegają *de novo* metylacji (ryc. 1) [1,8,10,20,24]. Metylacja genomu zarodka (niezależna od piętnowania), jest kontrolowana podczas kolejnych cykli replikacyjnych przez metylotransferazy DNA (DNMT – DNA-methyltransferase), głównie DNMT3a, DNMT3b oraz DNMT3L [11,25,55,56].



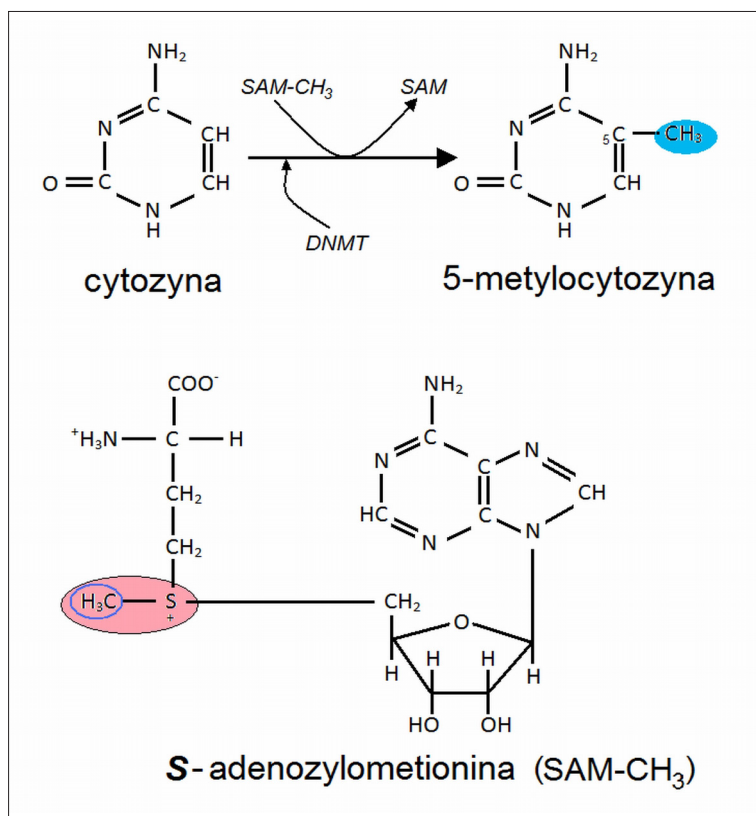
Ryc. 1. Zjawisko piętnowania gamet (schemat); na chromosomach zaznaczono kolorami: czerwony – piętnowanie genów matki, zielony – piętnowanie genów ojca

Zaobserwowano, że zaburzenia w funkcjonowaniu tych enzymów lub brak ich funkcji podczas spermatogenezy powodują zaburzenia przebiegu metylacji lub jej zatrzymanie. Metylaza DNMT (homolog myszy – Dnmt) katalizują przeniesienie grupy metylowej z donora (S-adenozylometionina) na pozycję 5' pierścienia cytozyny w dinukleotydach wysp CpG (ryc. 2). W czasie trwania stadiów zygota – blastocysta odbywa się pasywna demetylacja genomu zależna od replikacji, ponieważ enzym Dnmt1 nie ma dostępu do jądra komórkowego aż do zarodkowego stadium ośmiokomórkowego, kiedy to wnika do niego i bierze udział w jednym cyklu replikacyjnym, a następnie ponownie zostaje wykluczony [29]. Sposób funkcjonowania metylazy Dnmt1 odkryto u myszy, u których zastosowano wykluczenie genu (nokaut) postaci Dnmt1 oocytowej i przedimplantacyjnej, kiedy to wykazano, że brak tego enzymu w oocytach powoduje obumieranie większości potomstwa na wczesnym etapie rozwoju. Ponadto allele z piętnem tracą około 50% metylacji, co podkreśla rolę enzymu podczas zapłodnienia [43,59]. Po implantacji zarodka niezmetylowane allele genów z piętnem ulegają metylacji *de novo* przez metylazy Dnmt3a i 3b [11,24,25,55,56]. Potwierdziły to badania prowadzone na myszach z nokautami genów kolejnych demetylaz DNA:

- (i) genotyp *Dnmt1^{-/-}*: zatrzymanie rozwoju zarodka od 8,5 dnia po demetylacji genomu;
- (ii) genotyp *Dnmt3a^{-/-}*: zaburzenia funkcjonowania jelita, defekt spermatogenezy oraz śmierć w wieku 4 tygodni;
- (iii) genotyp *Dnmt3b^{-/-}*: demetylacja satelitarnego DNA, defekty w cewie nerwowej oraz obumarcie zarodka w 14,5–18,5 dniu rozwoju;
- (iv) genotyp *Dnmt3a^{-/-}, 3b^{-/-}*: zablokowanie inicjacji metylacji DNA zarodka *de novo* po implantacji oraz zatrzymanie rozwoju zarodka po 8,5 dniach;
- (v) genotyp *Dnmt3l^{-/-}*: uniemożliwienie utrzymania piętna matczynego w oocytach oraz niepłodność samców na skutek defektów spermatogenezy [55]. Demetylaza *Dnmt3l* ma zdolność autometylacji [1,73].

PIĘTNOWANIE GAMET A TECHNIKI WSPOMAGANEGO ROZRODU

Liczne badania dowiodły, że zaburzenia wzoru piętna mogą być odpowiedzialne za nieprawidłowy rozwój zarodka oraz mogą wykazywać ścisły związek z niektórymi chorobami o podłożu genetycznym [2,3,15,28,46,48,69]. Do prawidłowego rozwoju zarodka niezbędne jest wymazanie piętna gamet podczas gametogenezy. Jeżeli w technikach wspomaganego rozrodu (ART – human-assisted reproduction technologies) stanowiących w niektórych krajach aż 1-3% wszystkich żywych urodzeń, zostaną wykorzystane gamety, które nie osiągnęły wymaganego poziomu dojrzałości, w powstałym zarodku mogą się pojawić zaburzenia rozwoju na skutek braku prawidłowej aktywacji genów niezbędnych do jego rozwoju [12,14,48,49]. Dotyczy to w szczególności zastosowania metody docytoplazmatycznej mikroiniekcji plemnika (ICSI – intra-cytoplasmic sperm injection) [51]. Zaburzenia piętnowania mogą także wynikać z dojrzewania oocytów *in vitro*, przeprowadzania manipulacji na oocytach i hiperstymulacji jajników, a także w wyniku pozyskiwania do rozrodu niedojrzałych plemników [2]. Może to wynikać z tego, iż geny ulegają piętnowaniu na różnym etapie rozwoju komórek rozrodczych [64]. Zaobserwowano więcej nieprawidłowości



Ryc. 2. Mechanizm metylacji cytozyny w pozycji 5 przez metylotransferazę DNMT

w piętnowaniu matczynym [76]. Ciekawym wydaje się stwierdzenie, że zmiany wzoru metylacji DNA towarzyszące piętnowaniu, mogą być także wynikiem sposobu odżywiania się matki podczas ciąży [42,66,74] oraz mogą być związane z przeżytym stresem [6]. Wpływ zmian epigenetycznych daje się zauważyć również w przypadku klonowania somatycznego [16]. Większość zarodków uzyskanych w ten sposób charakteryzuje się wieloma zaburzeniami rozwojowymi lub zamiera krótko po implantacji. Sugeruje się, że przyczyną tego zjawiska może być brak odpowiednich warunków do przeprogramowania jądra somatycznego w zarotyczne. Jądro komórki somatycznej ma bowiem już swoją historię i po wielu podziałach mitotycznych ekspresja genów jest w nim inna od ekspresji genów jądra zygotycznego.

ZABURZENIA PIĘTNOWANIA GAMET A CHOROBY GENETYCZNE

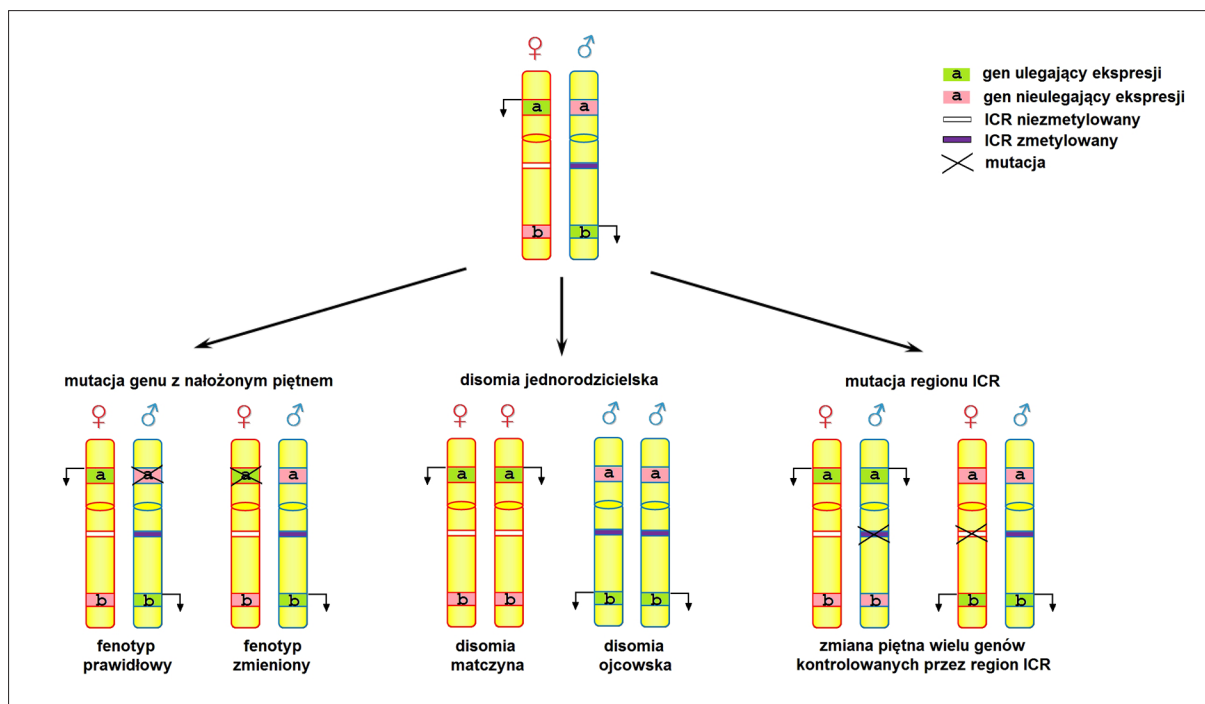
W przypadku większości genów autosomalnych allele ojca i matki są równocenne – nie ma różnic w potencjale ekspresji między dwoma rodzicielskimi allelami. Jednak wiele genów u człowieka znanych jest z ekspresji tylko jednego allelu rodzicielskiego – matczynego lub ojcowskiego, nigdy zaś z obu jednocześnie. Jeden z alleli ulega represji w danym typie komórki przy zachowaniu prawidłowej, niezmięnionej aktywności drugiego allelu. W niektórych przypadkach wybór allelu ulegającego ekspresji nie jest przypadkowy, a allel ulegający represji jest wtedy dziedziczony zawsze po ojcu lub zawsze po matce (ryc. 3) [1,42,43,56,59].

Zaobserwowano związek zaburzeń piętnowania rodzicielskiego z chorobami genetycznymi potomstwa, których

jednym z objawów jest opóźniony rozwój umysłowy. Są to m.in.: zespół Angelmana (AS)/Pradera-Williego (PWS) (*locus* 15q11-q13), Beckwitha-Wiedemanna (BWS) (11p15.5), Silvera-Russella (SRS) oraz tzw. syndrom dużego potomstwa (u owiec i bydła) [2,19,52,68,72]. Zaobserwowano także związek zaburzeń piętnowania z pojawianiem się zmian nowotworowych. Sugeruje się, że na skutek hipometylacji protoonkogenów dochodzi do ich ekspresji i pojawienia się nowotworu [20,62]. Zaobserwowano także zmieniony wzór metylacji genu *H19* (11p15.5) u 25% mężczyzn z oligozoospermią [18,50,51]. Gen *H19* piętnowany jest ojcowsko, obserwuje się stosunkowo wysoki poziom mRNA dla tego genu i ulega on ekspresji w trofoblastycie [62,70]. Zaobserwowano, że hipometylacja genu *H19* może być czynnikiem prowadzącym do inaktywacji genu *IGF2* w obu allelach rodzicielskich, co skutkuje zaburzeniami w rozwoju zarodka i może być przyczyną powstania kosmówczaka [62,70].

U człowieka opisano dotąd wiele przykładów chorób związanych z zaburzeniami piętnowania, jakkolwiek zespoły Angelmana (AS), Pradera-Williego (PWS) oraz Beckwitha-Wiedemanna (BWS) i Silvera-Russella (SRS) stanowią choroby opisywane zarówno klinicznie jak i molekularnie.

Zespół Angelmana – występuje z częstotliwością 1/12000 urodzeń, charakteryzuje się opóźnieniem umysłowym, zaburzeniami mowy, ataksją ruchową, autyzmem, nadpobudliwością (częsty śmiech, podniecenie). Często towarzyszy mu mniejsza masa mózgu. Jest wynikiem braku ekspresji lub też utraty funkcjonalności genu *UBE3A* dziedziczony po matce, umiejscowionego w *locus* 15q11.2-q13 [22,49]. Produkt tego genu – ligaza ubikwitynowa, jest



Ryc. 3. Mechanizmy prowadzące do zaburzenia ekspresji genów z piętnem znajdujących się na chromosomach matczynym lub/i ojcowskim; ICR – region kontroli piętnowania

odpowiedzialny za wskazanie wybranych białek do degradacji poprzez ich ubiquitytację. Gen *UBE3A* jest genem napiętnowanym i ulega ekspresji tylko w mózgu z allelu matczynym, natomiast ojcowska kopia pozostaje wyciszona [22,49,75].

Zespół Pradera-Williego – charakteryzuje się hipotonią, problemami z ssaniem u noworodka oraz nadmiernym apetytem prowadzącym z wiekiem do rozwoju otyłości (przypuszczalnie na skutek zaburzonej regulacji homeostazy glukozy przez białko regulatorowe NRF-1 lub zaburzonej ekspresji genu *MEGEL2* na wczesnych etapach rozwoju układu nerwowego) [13,57]. Również zdolności motoryczne i nauka mowy są nieprawidłowe. Towarzyszą mu także hipogonadyzm i niepłodność. Przypuszcza się, że za uwidocznienie fenotypu PWS odpowiedzialna jest ekspresja allelu ojcowskiego, przy wyciszonym allelu matki [22,49,72].

Oba zespoły, zarówno AS jak i PWS, wykazują różne, charakterystyczne dla siebie objawy fenotypowe, tym niemniej mikrodelecja regionu 15q11.2-q13 jest elementem wspólnym obu zespołów. W regionie tym znajduje się wiele genów, których delecja oraz zjawisko piętnowania powoduje, że ta sama wada genetyczna fenotypowo objawia się w różny sposób. W przypadku AS występuje mikrodelecja genu *UBE3A* na allelu matczynym, gdzie znajduje się aktywna kopia tego genu, jakkolwiek cechy fenotypowe nie wynikają z utraty innych genów z piętnem znajdujących się także w tym regionie. Natomiast w przypadku PWS jest odwrotnie – fenotyp jest wynikiem mikrodelecji prowadzącej do utraty genów, które ulegały ekspresji z allelu ojcowskiego, a utrata ojcowskiej kopii genu *UBE3A* nie jest czynnikiem prowadzącym do zmian fenotypowych, ponieważ gen ten jest wyciszony [22,71].

Istnieje wiele mechanizmów molekularnych oprócz opisanej wyżej mikrodelecji, które mogą wywoływać obydwie zespoły [2,28,71]. Delecja regionu 15q11.2-q13 zawierającego aktywną kopię genu *UBE3A* występuje w 65–75% przypadków AS [2,28,71]. Do innych przyczyn należy także **ojcowska disomia jednorodzielska** (UPD – paternal uniparental disomy), w której obie kopie chromosomu 15 są dziedziczone ojcowsko i tym samym zawierają piętno ojcowskie z wyciszoną kopią genu *UBE3A* [28,71]. W takim przypadku mówi się o przyczynach epigenetycznych AS, a nie genetycznych, ponieważ nie dochodzi do zmian w sekwencji DNA. Mechanizm ten stanowi 5% przypadków AS. Ponadto mutacje punktowe genu *UBE3A* (10% przypadków) prowadzące do utraty funkcji genu, przy jednoczesnej ekspresji kopii matczynnej i zachowanym prawidłowym wzorze piętnowania, też mogą powodować AS [28,71]. Również zakłócenia samego piętnowania polegające na tym, iż kopia matczyna ma epigenom ojcowski, stanowią 2–3% przypadków AS. Tego typu zakłócenia prowadzić mogą do zmian w sekwencji nukleotydowej DNA, a zwłaszcza do małych delecji nukleotydów w tzw. centrum piętnowania (IC – imprinting center lub ICR – imprinting control region), którego funkcja nie jest dokładnie poznana, ale przypuszcza się, że może mieć udział w ustalaniu prawidłowego wzoru piętnowania alleli rodzicielskich [72]. Na przykład domena o zróżnicowanej metylacji (DMD – differentially methylated domain lub DMR – differentially methylated region) [58], długości 2 kpz, umiejscowiona na allelu ojcowskim genu *H19* w odległości -2 do -4 kpz od miejsca startu transkrypcji, odgrywa rolę centrum piętnowania, którego delecja powoduje utratę piętna genów *H19* i *IGF2* [4,58,65]. IC/ICR są to sekwencje DNA umiejscowione w pobliżu promotorów genów piętnowanych. Regiony te zawierają tandemowo ułożone sekwencje repetytywne. Średnia długość

ICR wynosi 18–170 pz i jest powtórzona 6–9 razy. Do takich miejsc mogą się przyłączać czynniki transkrypcyjne, np. CTCF (CCCTC-binding factor – istotny dla ICR piętnowanej domeny *H19/Igf2*), czy czynnik YY1 (dla DMR genu *Peg3*) [34,35,60,61]. YY1 jest białkiem typu Gli-Kruppel, które rozpoznaje sekwencję CGCCATnTT (n – dowolny nukleotydy) umiejscowioną blisko promotora lub pierwszego intronu genów *Peg3*, *Xist*, *Tsix*, *Nespas*. YY1 zawiera motyw palców cynkowych wiążących się do DMR wymienionych genów [35,36,37]. Białko to powoduje wzrost wydajności transkrypcyjnej. Ponadto wpływa na zmianę oddziaływań przestrzennych między składnikami kompleksu transkrypcyjnego poprzez wyginanie cząsteczki DNA w rejonie promotora. Wzór metylacji IC/ICR jest różny w zależności od pochodzenia – centrum matczyne zawiera więcej metylowanych wysp CpG niż centrum ojcowskie [40]. Około 80% genów z piętnem jest fizycznie połączonych między sobą zespołowo, co umożliwia wspólny udział ICR i elementów regulatorowych [60].

Zespół Beckwitha-Wiedemanna – pojawia się z częstotliwością 1/14000 żywych narodzin i charakteryzuje się: makrosomią płodową, ubytkiem powłok jamy brzusznej, hipoglikemią okołourodzeniową oraz powiększonym językiem. Ponadto BWS często towarzyszą: hemihipertrofia (nierówny wzrost jednej części ciała względem drugiej), organomegalia, charakterystyczny wygląd twarzy i kształt uszu. Dzieci z zespołem BWS częściej zapadają na nowotwory zarodkowe oraz guz Willmsa (u 5–7% dzieci z BWS). Zaobserwowano, że wszystkie przyczyny występowania BWS są ściśle związane ze zjawiskiem piętnowania. Największy odsetek sporadycznych przypadków BWS (60%) wynika ze zmian metylacji wpływających na ekspresję alleli z piętnem ojcowskim (*IGF2* i *KCNQ1OT*) lub matczynym (*H19* i *CDKN1C*). Prawie 20% stanowią przypadki wynikające z disomii jednorodzicielskiej ze strony ojcowskiej, natomiast etiologia mechanizmu powstawania około 25% przypadków pozostaje niewyjaśniona [48,49]. Prawie 40% przypadków BWS jest następstwem utraty metylacji matczynej, co prowadzi do epimutacji i defektu w IC2. Szacuje się, że wśród około 1% przypadków BWS pojawieniu się AS mogą towarzyszyć nie zrównoważone translokacje chromosomowe obejmujące region na ramieniu q chromosomu 15 [48].

Zespół Silvera-Russella – jest klinicznie heterogennym zespołem zaobserwowanym po raz pierwszy w połowie lat 50 ub. w. niezależnie przez Silvera i Russella [19,21,63]. Charakteryzuje się m.in. opóźnionym wzrostem wewnątrzmacicznym, któremu towarzyszą asymetria i dysmorfia ciała, zahamowany rozwój czaszki, charakterystyczne rysy twarzy (w tym nisko osadzone uszy), nadmierna potliwość oraz hipoglikemia. Zespół ten nie jest szczegółowo opisany pod względem molekularnym, jednak wiadomo, że jego występowanie ma ścisły związek z piętnem genów umiejscowionych na chromosomach 7, 8, 11, 15, 17 i 18 [7,19,21,63]. Przyczynami SRS opisanymi najszerzej są zaburzenia piętna na chromosomach 7 i 11, co stanowi 70% przypadków tego zespołu. W tym 60% dotyczy dysregulacji genów z piętnem w *locus* 11p15, gdzie dochodzi do epimutacji ICR1, a to z kolei prowadzi do hipometylacji ICR1 w *locus* genów *IGF2/H19* [19,63]. Szacuje się, że w 35–65% przypadków SRS fenotyp jest ściśle związany z hipometylacją genu *H19* [21,63]. Około 10% przypadków dotyczy disomii jednorodzicielskiej (UPD) chromosomu 7 pochodzenia

matczynej, na którym zaburzeniu ulega wzór piętna w *loci* 7p11.2-p13 i/lub 7q31-qter. Również dziedziczenie mutacji genu *CFTR* pochodzenia matczynej może być przyczyną wystąpienia SRS, jednak nadal nie jest to pewne [7,63].

BIĄŁKO BORIS

Białko BORIS (brother of regulation of imprinted sites) jest swoistym dla męskich komórek rozrodczych paralogiem białka CTCF [39,67]. Obydwa białka biorą udział w regulacji epigenetycznej genów przez tworzenie insulatorów wrażliwych na metylację, które są odpowiedzialne m.in. za inaktywację chromosomu X oraz ekspresję genów z piętnem [77]. Są to białka zachowane w ewolucji, które pojawiły się przeszło 100 mln lat temu [27]. Ulegają ubikwitynacji oraz mogą się wiązać do ponad 20000 miejsc w ludzkim genomie. Ponadto mają domenę złożoną z 11 palców cynkowych, ale różne końce: aminowy i karboksylowy, co jest czynnikiem decydującym o różnicowanej funkcji obu białek [45]. CTCF ulega ekspresji we wszystkich tkankach organizmu, natomiast BORIS obecne jest wyłącznie w gonadzie męskiej i ulega ekspresji w trakcie spermatogenezy [45,67]. Wyjątek stanowią nowotwory, w obecności których dochodzi do ekspresji tego białka w różnych tkankach. BORIS odpowiedzialne jest za utrzymanie różnego wzoru metylacji w ICR genów *IGF2/H19* [32]. U myszy, u których ekspresja genów zależy od ICR, BORIS wiąże się podczas metylacji z ICR, CTCF również do ICR, ale tylko do niezmetylowanego chromosomu pochodzenia matczynej. Można więc powiedzieć, że BORIS ustanawia wzór metylacji, który następnie ulega interpretacji przez CTCF, a to w konsekwencji prowadzi do regulacji ekspresji genów piętnowanych *Igf2/H19* [7].

Sposób dziedziczenia fenotypu spowodowanego przez mutację genu z piętnem nie przekłada się na sposób dziedziczenia autosomalny dominujący, autosomalny recesywny czy związany z chromosomem X. Fenotyp obecny jest wyłącznie wtedy, gdy zmutowany allel jest dziedziczony na chromosomie ojcowskim i ulega ekspresji w przeciwieństwie do wyciszzonego. Powoduje to obecność tych samych nieprawidłowości genetycznych u odległych sobie członków rodziny. W przypadku mutacji w genie *UBE3A* lub też wystąpieniu defektu IC, niezwykle istotne jest to, kto przekazuje zmutowany allel potomstwu. AS obserwowany jest tylko w wyniku przekazania mutacji w linii matczynej [75]. Mutacja tego genu w kopii allelu odziedziczonego po ojcu będzie wyciszona i tym samym nie pojawi się fenotyp AS. Ojciec nosiciel zmutowanego allelu przekaże mutację 50% potomstwa (zawiera 2 allele, 1 z mutacją, drugi bez), a ponieważ jednocześnie ma on allel podlegający imprintingowi, gen będzie wyciszony [75]. Matka, która odziedziczyła zmutowany gen po swoim ojcu będzie z kolei przekazywała potomstwu to piętnowanie i tym samym, jeśli przekaże ona zmutowaną kopię potomstwu, będzie ono posiadało mutację na aktywnym allelu [75].

Należy zwrócić również uwagę na tzw. hipotezę konfliktu materiału genetycznego ojca i matki [23,30,31,52]. Mówi ona, że genom ojcowski ukierunkowany jest na maksymalne wykorzystanie zasobów matczynej do rozwoju potomstwa, aby było duże, zdrowe i dobrze rozwinięte. Jednocześnie genom matki nastawiony jest na zabezpieczenie zasobów przyszłemu potomstwu, tak aby ich wielkość

i liczebność pozostała optymalna. Hipoteza konfliktu jest zgodna z obserwacjami prawidłowej ekspresji większości genów ulegających piętnowaniu.

Piętnowanie genów odgrywa znaczącą rolę podczas rozwoju nowego organizmu, rozwoju poszczególnych linii

komórkowych oraz w uwarunkowaniu niektórych chorób, tak więc poznanie zasad rządzących zmianami epigenetycznymi, zwłaszcza dotyczących wzorów metylacji poszczególnych genów, chromosomów, a nawet całego genomu, wydaje się jednym z ważnych priorytetów współczesnej nauki.

PIŚMIENICTWO

- [1] Allegrucci C., Thurston A., Lucas E., Young L.: Epigenetics and the germline. *Reproduction*, 2005; 129: 137–149
- [2] Allen C., Reardon W.: Assisted reproduction technology and defects of genomic imprinting. *BJOG*, 2005; 112: 1589–1594
- [3] Amor D.J., Halliday J.: A review of known imprinting syndromes and their association with assisted reproduction technologies. *Hum. Reprod.*, 2008; 23: 2826–2834
- [4] Arney K.L.: H19 and Igf2 – enhancing the confusion? *Trends Genet.*, 2003; 19: 17–23
- [5] Barton S.C., Surani M.A., Norris M.L.: Role of paternal and maternal genomes in mouse development. *Nature*, 1984; 311: 374–376
- [6] Bellinger D.L., Lubahn C., Lorton D.: Maternal and early life stress effects on immune function: relevance to immunotoxicology. *J. Immunotoxicol.*, 2008; 5: 419–444
- [7] Bernier-Latmani J., Baumer A., Shaw P.: No evidence for mutations of CTCFL/BORIS in Silver-Russell syndrome patients with IGF2/H19 imprinting control region 1 hypomethylation. *PLoS One*, 2009; 4: e6631
- [8] Biermann K., Steger K.: Epigenetics in male germ cells. *J. Androl.*, 2007; 28: 466–480
- [9] Black J.C., Whetstone J.R.: Chromatin landscape: Methylation beyond transcription. *Epigenetics*, 2011; 6: 9–15
- [10] Bourc'his D., Proudhon C.: Sexual dimorphism in parental imprint ontogeny and contribution to embryonic development. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2008; 282: 87–94
- [11] Bourc'his D., Xu G.L., Lin C.S., Bollman B., Bestor T.H.: Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science*, 2004; 294: 2536–2539
- [12] Bukulmez O.: Does assisted reproductive technology cause birth defects? *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, 2009; 21: 260–264
- [13] Cam H., Balcunaite E., Blais A., Spektor A., Scarpulla R.C., Young R., Kluger Y., Dynlacht B.D.: A common set of gene regulatory networks links metabolism and growth inhibition. *Mol. Cell*, 2004; 16: 399–411
- [14] Carrell D.T.: Contributions of spermatozoa to embryogenesis: assays to evaluate their genetic and epigenetic fitness. *Reprod. Biomed. Online*, 2008; 16: 474–484
- [15] De Rycke M., Liebaers I., Van Steirteghem A.: Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: risk analysis and epigenetic inheritance. *Hum. Reprod.*, 2002; 17: 2487–2494
- [16] Eilertsen K.J., Power R.A., Harkins L.L., Mísica P.: Targeting cellular memory to reprogram the epigenome, restore potential, and improve somatic cell nuclear transfer. *Anim. Reprod. Sci.*, 2007; 98: 129–146
- [17] Engelstädter J.: Constraints of the evolution of asexual reproduction. *Bioessays*, 2008; 30: 1138–1150
- [18] Filipponi D., Feil R.: Perturbation of genomic imprinting in oligozoospermia. *Epigenetics*, 2009; 4: 27–30
- [19] Gicquel C., Rossignol S., Cabrol S., Houang M., Steunou V., Barbu V., Danton F., Thibaud N., Le Merrer M., Burglen L., Bertrand A.M., Netchine I., Le Bouc Y.: Epimutation of the telomeric imprinting center region on chromosome 11p15 in Silver-Russell syndrome. *Nat. Genet.*, 2005; 37: 1003–1007
- [20] Godmann M., Lambrot R., Kimmins S.: The dynamic epigenetic program in male germ cells: Its role in spermatogenesis, testis cancer, and its response to the environment. *Microsc. Res. Tech.*, 2009; 72: 603–619
- [21] Gucev Z.S., Tasic V., Jancevska A., Kirovski I.: A case of Silver-Russell syndrome (SRS): multiple pituitary hormone deficiency, lack of H19 hypomethylation and favourable growth hormone (GH) treatment response. *J. Genet.*, 2009; 88: 239–243
- [22] Gurrieri F., Accadia M.: Genetic imprinting: the paradigm of Prader-Willi and Angelman syndromes. *Endocr. Dev.*, 2009; 14: 20–28
- [23] Haig D.: Genomic imprinting and the theory of parent-offspring conflict. *Semin. Dev. Biol.*, 1992; 3: 153–160
- [24] Hajkova P., Erhardt S., Lane N., Haaf T., El-Maarri O., Reik W., Walter J., Surani M.A.: Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech. Dev.*, 2002; 117: 15–23
- [25] Hata K., Okano M., Lei H., Li E.: Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of *de novo* DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development*, 2002; 129: 1983–1993
- [26] Hiura H., Obata Y., Komiyama J., Shirai M., Kono T.: Oocyte growth-dependent progression of maternal imprinting in mice. *Genes Cells*, 2006; 11: 353–361
- [27] Hore T.A., Deakin J.E., Marshall Graves J.A.: The evolution of epigenetic regulators CTCF and BORIS/CTCF in amniotes. *PLoS Genet.*, 2008; 4: e1000169
- [28] Horsthemke B., Wagstaff J.: Mechanisms of imprinting of the Prader-Willi/Angelman region. *Am. J. Med. Genet. A*, 2008; 146A: 2041–2052
- [29] Howell C.Y., Bestor T.H., Ding F., Latham K.E., Mertineit C., Trasler J.M., Chaillet J.R.: Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene. *Cell*, 2001; 104: 829–838
- [30] Isles A.R., Holland A.J.: Imprinted genes and mother-offspring interactions. *Early Hum. Dev.*, 2005; 81: 73–77
- [31] Iwasa Y.: The conflict theory of genomic imprinting: how much can be explained? *Curr. Top. Dev. Biol.*, 1998; 40: 255–293
- [32] Jelinic P., Stehle J.C., Shaw P.: The testis-specific factor CTCFL cooperates with the protein methyltransferase PRMT7 in H19 imprinting control region methylation. *PLoS Biol.*, 2006; 4: e355
- [33] Jiang H., Sun B., Wang W., Zhang Z., Gao F., Shi G., Cui B., Kong X., He Z., Ding X., Kuang Y., Fei J., Sun Y.J., Feng Y., Jin Y.: Activation of paternally expressed imprinted genes in newly derived germline-competent mouse parthenogenetic embryonic stem cell lines. *Cell Res.*, 2007; 17: 792–803
- [34] Kim J.: Multiple YY1 and CTCF binding sites in imprinting control regions. *Epigenetics*, 2008; 3: 115–118
- [35] Kim J., Kollhoff A., Bergmann A., Stubbs L.: Methylation-sensitive binding of transcription factor YY1 to an insulator sequence within the paternally expressed imprinted gene, Peg3. *Hum. Mol. Genet.*, 2003; 12: 233–245
- [36] Kim J.D., Hinz A.K., Bergmann A., Huang J.M., Ovcharenko I., Stubbs L., Kim J.: Identification of clustered YY1 binding sites in imprinting control regions. *Genome Res.*, 2006; 16: 901–911
- [37] Kim J.D., Hinz A.K., Choo J.H., Stubbs L., Kim J.: YY1 as a controlling factor for the Peg3 and Gnas imprinted domains. *Genomics*, 2007; 89: 262–269
- [38] Kimmins S., Sassone-Corsi P.: Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature*, 2005; 434: 583–589
- [39] Klenova E.M., Morse H.C. III, Ohlsson R., Lobanenkov V.V.: The novel BORIS + CTCF gene family is uniquely involved in the epigenetics of normal biology and cancer. *Semin. Cancer Biol.*, 2002; 12: 399–414
- [40] Kobayashi H., Suda C., Abe T., Kohara Y., Ikemura T., Sasaki H.: Bisulfite sequencing and dinucleotide content analysis of 15 imprinted mouse differentially methylated regions (DMRs): paternally methylated DMRs contain less CpGs than maternally methylated DMRs. *Cytogenet. Genome Res.*, 2006; 113: 130–137
- [41] Kono T.: Genetic modification for bimaternal embryo development. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2009; 21: 31–36
- [42] Le Clair C., Abbi T., Sandhu H., Tappia P.S.: Impact of maternal undernutrition on diabetes and cardiovascular disease risk in adult offspring. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 2009; 87: 161–179
- [43] Li E.: Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.*, 2002; 3: 662–673
- [44] Li J.Y., Lees-Murdock D.J., Xu G.L., Walsh C.P.: Timing of establishment of paternal methylation imprints in the mouse. *Genomics*, 2004; 84: 952–960

- [45] Loukinov D.I., Pugacheva E., Vatolin S., Pack S.D., Moon H., Chernukhin I., Mannan P., Larsson E., Kanduri C., Vostrov A.A., Cui H., Niemitz E.L., Rasko J.E., Docquier F.M., Kistler M., Breen J.J., Zhuang Z., Quitschke W.W., Renkawitz R., Klenova E.M., Feinberg A.P., Ohlsson R., Morse H.C. III, Lobanenkov V.V.: BORIS, a novel male germ-line-specific protein associated with epigenetic reprogramming events, shares the same 11-zinc-finger domain with CTCF, the insulator protein involved in reading imprinting marks in the soma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 6806–6811
- [46] Lucifero D., Chaillet J.R., Trasler J.M.: Potential significance of genomic imprinting defects for reproduction and assisted reproductive technology. *Hum. Reprod. Update*, 2004; 10: 3–18
- [47] Lucifero D., Mann M.R., Bartolomei M.S., Trasler J.M.: Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting. *Hum. Mol. Genet.*, 2004; 13: 839–849
- [48] Maher E.: Imprinting and assisted reproductive technology. *Hum. Mol. Genet.*, 2005; 14(Suppl.1): R133–R138
- [49] Manipalviratn S., DeCherney A., Segars J.: Imprinting disorders and assisted reproductive technology. *Fertil. Steril.*, 2009; 91: 305–315
- [50] Marques C.J., Costa P., Vaz B., Carvalho F., Fernandes S., Barros A., Sousa M.: Abnormal methylation of imprinted genes in human sperm is associated with oligozoospermia. *Mol. Hum. Reprod.*, 2008; 14: 67–74
- [51] Marques C.J., Francisco T., Sousa S., Carvalho F., Barros A., Sousa M.: Methylation defects of imprinted genes in human testicular spermatozoa. *Fertil. Steril.*, 2010; 94: 585–594
- [52] Moore T., Haig D.: Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. *Trends Genet.*, 1991; 7: 45–49
- [53] Morison I.M., Ramsay J.P., Spencer H.G.: A census of mammalian imprinting. *Trends Genet.*, 2005; 21: 457–465
- [54] Obata Y., Kono T.: Maternal primary imprinting is established at a specific time for each gene throughout oocyte growth. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 5285–5289
- [55] Okano M., Bell D.W., Haber D.A., Li E.: DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for *de novo* methylation and mammalian development. *Cell*, 1999; 99: 247–257
- [56] Okano M., Xie S., Li E.: Dnmt2 is not required for *de novo* and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.*, 1998; 26: 2536–2540
- [57] O'Neill M.A., Farooqi I.S., Wevrick R.: Evaluation of Prader-Willi Syndrome gene MAGEL2 in severe childhood-onset obesity. *Obes. Res.*, 2005; 13: 1841–1842
- [58] Paoloni-Giacobino A., D'Aiuto L., Cirio M.C., Reinhart B., Chaillet J.R.: Conserved features of imprinted differentially methylated domains. *Gene*, 2007; 399: 33–45
- [59] Reik W., Santos F., Dean W.: Mammalian epigenomics: reprogramming the genome for development and therapy. *Theriogenology*, 2003; 59: 21–32
- [60] Reinhart B., Chaillet J.R.: Genomic imprinting: cis-acting sequences and regional control. *Int. Rev. Cytol.*, 2005; 243: 173–213
- [61] Reinhart B., Paoloni-Giacobino A., Chaillet J.R.: Specific differentially methylated domain sequences direct the maintenance of methylation at imprinted genes. *Mol. Cell. Biol.*, 2006; 26: 8347–8356
- [62] Riccio A., Sparago A., Verde G., De Crescenzo A., Citro V., Cubellis M.V., Ferrero G.B., Silengo M.C., Russo S., Larizza L., Cerrato F.: Inherited and sporadic epimutations at the IGF2-H19 locus in Beckwith-Wiedemann syndrome and Wilms' tumor. *Endocr. Dev.*, 2009; 14: 1–9
- [63] Rossignol S., Netchine I., Le Bouc Y., Gicquel C.: Epigenetics in Silver-Russell syndrome. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2008; 22: 403–414
- [64] Sato A., Otsu E., Negishi H., Utsunomiya T., Arima T.: Aberrant DNA methylation of imprinted loci in superovulated oocytes. *Hum. Reprod.*, 2007; 22: 26–35
- [65] Smith R.J., Arnaud P., Kelsey G.: Identification and properties of imprinted genes and their control elements. *Cytogenet. Genome Res.*, 2004; 105: 335–345
- [66] Sovik O., Tansek M.Z., Sagen J.V., Njolstad P.R.: Management of neonatal and infancy-onset diabetes mellitus. *Endocr. Dev.*, 2007; 11: 94–105
- [67] Tamminga J., Kathiria P., Koturbash I., Kovalchuk O.: DNA damage-induced upregulation of miR-709 in the germline downregulates BORIS to counteract aberrant DNA hypomethylation. *Cell Cycle*, 2008; 7: 3731–3736
- [68] Temple I.K.: Imprinting in human disease with special reference to transient neonatal diabetes and Beckwith-Wiedemann syndrome. *Endocr. Dev.*, 2007; 12: 113–123
- [69] Thompson J.R., Williams C.J.: Genomic imprinting and assisted reproductive technology: connections and potential risks. *Semin. Reprod. Med.*, 2005; 23: 285–295
- [70] Ueda T., Abe K., Miura A., Yuzuriha M., Zubair M., Noguchi M., Niwa K., Kawase Y., Kono T., Matsuda Y., Fujimoto H., Shibata H., Hayashizaki Y., Sasaki H.: The paternal methylation imprint of the mouse H19 locus is acquired in the gonocyte stage during foetal testis development. *Genes Cells*, 2000; 5: 649–659
- [71] Varela M.C., Kok F., Setian N., Kim C.A., Koiffmann C.P.: Impact of molecular mechanisms, including deletion size, on Prader-Willi syndrome phenotype: study of 75 patients. *Clin. Genet.*, 2005; 67: 47–52
- [72] Verona R.I., Mann M.R., Bartolomei M.S.: Genomic imprinting: intricacies of epigenetic regulation in clusters. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2003; 19: 237–259
- [73] Waggoner D.: Mechanisms of disease: epigenesis. *Semin. Pediatr. Neurol.*, 2007; 14: 7–14
- [74] Waterland R.A., Jirtle R.L.: Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. *Nutrition*, 2004; 20: 63–68
- [75] Webster K.E., O'Bryan M.K., Fletcher S., Crewther P.E., Aapola U., Craig J., Harrison D.K., Aung H., Phutikanit N., Lyle R., Meachem S.J., Antonarakis S.E., de Kretser D.M., Hedger M.P., Peterson P., Carroll B.J., Scott H.S.: Meiotic and epigenetic defects in Dnmt3L-knockout mouse spermatogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005; 102: 4068–4073
- [76] Wilkins-Haug L.: Epigenetics and assisted reproduction. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, 2009; 21: 201–206
- [77] Xu N., Donohoe M.E., Silva S.S., Lee J.T.: Evidence that homologous X-chromosome pairing requires transcription and Ctfp protein. *Nat. Genet.*, 2007; 39: 1390–1396

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.